Aus der Medizinischen Klinik der Universität Bern
Direktor: Prof. Dr. W. Frey

Die Bestimmung des Polypeptid- und Eiweissgehaltes im Urin und ihre Bedeutung für die Beurteilung der Durchlässigkeit der Nierenkapillaren

Inaugural-Dissertation
der Medizinischen Fakultät der Universität Bern
zur Erlangung der Doktorwürde

eingereicht von
Adolf Abplanalp
von Innertkirchen

Verlag Paul Haupt Bern 1941

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Bern
Direktor: Prof. Dr. W. Frey

Die Bestimmung des Polypeptid- und Eiweissgehaltes im Urin und ihre Bedeutung für die Beurteilung der Durchlässigkeit der Nierenkapillaren

Inaugural-Dissertation
der Medizinischen Fakultät der Universität Bern
zur Erlangung der Doktorwürde

eingereicht von
Adolf Abplanalp
von Innertkirchen

Verlag Paul Haupt Bern 1941

Auf Antrag des Herrn Prof. Dr. W. Frey von der medizinischen Fakultät zum Druck als Dissertation genehmigt.

Bern, den 7. Mai 1941.

Der Dekan der medizinischen Fakultät:

Prof. Dr. Bluntschli

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	5
Methodik	6
A. Methoden zur Dosierung der Polypeptide im Urin	6
B. Beschreibung der bei den folgenden Versuchen angewandten Methodik	8
Ergebnisse	14
A. Normaler Urin	14
B. Pathologisch veränderter Urin	17
Diskussion	18
Zusammenfassung	22
Literaturverzeichnis	24

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547622_0069

Einleitung

Mit den Polypeptiden haben sich in den letzten Jahren besonders französische Autoren intensiv beschäftigt und durch ausgedehnte Untersuchungen über den Polypeptidgehalt im Serum aufschlußreiche Ergebnisse, besonders für die Nieren- und Leberpathologie, erzielt. Obschon festgestellt wurde, daß auch der Urin Polypeptide enthält, und obschon Duval und Roux das weitere Schicksal der Serumpolypeptide diskutieren, wobei sie unter anderem auch eine Ausscheidung durch die Nieren angeben, fehlen doch in der Literatur genaue Angaben über den Polypeptidgehalt des Urins. Insbesondere werden Methoden zu seiner Messung nur beiläufig erwähnt und Ergebnisse derartiger Messungen nur vereinzelt angegeben.

Anderseits wurde die Donaggioreaktion, ein Ermüdungstest, der auf der Anwesenheit von polypeptidartigen Stoffen beruht, zuerst im Urin angestellt, und erst nachträglich wiesen Merkle und Horn die Anwesenheit derselben Stoffe im enteiweißten Serum nach. Die Polypeptide kommen somit im Blut und im Urin vor, und es ist deshalb für die Untersuchungen über das Vorkommen, die Bedeutung und das Schicksal der Polypeptide von großer Wichtigkeit, die Messungen im Serum und im Urin in möglichst analoger Weise vorzunehmen.

Die Polypeptide sind chemisch wohl als Kombinationen von mehreren Aminosäuren, die durch die Peptidbindung -CONH- zusammengekuppelt sind, definiert, doch fehlt vor allem eine klare Abgrenzung nach oben, gegenüber den komplizierteren eiweißartigen Stoffen. In Praxi, bei der quantitativen chemischen Erfassung der Polypeptide werden diese Schwierigkeiten noch größer, indem wir neben einer unklaren obern Grenze noch mit einer ungenauen untern Grenze zu rechnen haben, da die theoretisch klare untere Grenze durch unsere Reaktionen nicht absolut genau erfaßt werden kann.

Aus diesem Grunde wurden für den normalen Polypeptidgehalt des Serums von den verschiedenen Autoren je nach der Methode, ja sogar bei der gleichen Methode, je nach der Konzentration der Reagenzien, etwas verschiedene Werte angegeben. Keine Methode hat deshalb Anspruch auf absolute Richtigkeit.

Andererseits findet man bei Verwendung derselben Methode eine weitgehende Konstanz der Werte.

Nachdem Frau von May an der Berner medizinischen Klinik für die Bestimmung der Serumpolypeptide eine nach dem Prinzip der Doppelstickstoffbestimmung von Hahn und Wolff aufgebaute Methode eingeführt hat, wobei sie weitgehend die Technik von Fiessinger, Olivier und Herbain anwandte, lag es nahe, für die Bestimmung der Urinpolypeptide eine möglichst analoge Methode auszuarbeiten.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Schaffung einer Methode zum chemischen Nachweis der Urinpolypeptide in möglichster Analogie zu der Methode für die Bestimmung der Serumpolypeptide, wie sie von Frau von May aufgebaut wurde. Dabei zeigte es sich, daß gewissermaßen als Nebenprodukt auch der Eiweißgehalt des Urins bestimmt werden mußte, in ähnlicher Weise wie bei den Bestimmungen im Serum der Rest N bestimmt wird. Dieses „Nebenprodukt" ist sehr wertvoll, da die Polypeptidausscheidung, im Zusammenhang mit der Eiweißausscheidung betrachtet, besser beurteilt werden kann, als wenn man die Polypeptide für sich allein betrachtet. Die wenigen Autoren, die sich mit den Urinpolypeptiden beschäftigt haben, untersuchten die Polypeptide für sich allein, und haben vielleicht aus ihren Resultaten deshalb keine „déductions claires", wie sich Goiffon ausdrückt, ziehen können.

Methodik

A. Methoden zur Dosierung der Polypeptide im Urin

Eine Methode zur Bestimmung der Urinpolypeptide wurde von Goiffon und Spaey, eine andere Methode von Burstein angegeben. Beide beruhen auf dem Prinzip der Doppelstickstoffbestimmung von Hahn und Wolff, indem der Urin zweimal enteiweißt wird, einmal durch Trichloressigsäure (bei Burstein durch Kochen), sodann durch Phosphorwolframsäure, und indem aus der Differenz in den beiden Ausfällungen auf den Polypeptidgehalt geschlossen wird. Als Reagenzien verwenden Goiffon und Spaey die Trichloressigsäure 20 %ig und das Folin'sche Reagens (Natr. wolfram. 10 %ig 100,0, acid. phosphoric. 85 %ig 80,0, aqua ad 1000,0). Burstein enteiweißt einmal durch Kochen und benützt dann ebenfalls das Folin'sche Reagens.

Das Prinzip der Methode besteht darin, daß durch den „précipitant étendu", die Phosphorwolframsäure bzw. das Folin'sche Reagens das Eiweiß *und* die Polypeptide ausgefällt werden, während durch den „précipitant restreint", die Trichloressigsäure, bzw. das Kochen, *nur* das Eiweiß ausgefällt wird.

Dagegen ist von Martens und Terroine eingewendet worden, daß der „précipitant étendu", die Phosphorwolframsäure, einige Tripeptide nicht, dagegen aber einige Aminosäuren niederschlage, während der „précipitant restreint", die Trichloressigsäure, auch gewisse große Polypeptidmoleküle ausfälle. Auf diese ungenauen Abgrenzungen wurde schon in der Einleitung hingewiesen, und darauf aufmerksam gemacht, daß man nur Werte, die mit derselben Methode gemessen wurden, vergleichen darf.

Goiffon und Spaey fällen zuerst aus 30 ccm Urin, der mit Wasser etwas verdünnt wurde, durch Zugabe von 8 ccm Trichloressigsäure, 20 %ig, das Eiweiß aus. Es wird dann filtriert und auf zwei Drittel des Filtrates, die 20 ccm Urin entsprechen, 2 ccm Folin'sches Reagens beigegeben. Der sich bildende Niederschlag wird zentrifugiert und zweimal mit einer Waschflüssigkeit, bestehend aus Wasser und dem Fällungsmittel, gewaschen. Der gewaschene Niederschlag wird durch eine 10 %ige Lösung von Natr. bic. aufgelöst und diese Lösung in 2 gleiche Portionen geteilt. Zu der einen Portion wird $^1/_2$ ccm Folin'sches Reagens zugegeben, darauf zu beiden Portionen je 5 Tropfen des Phenolreagens von Folin und Denis, um dann colorimetrisch die Menge der Tyrosinkerne in beiden Portionen zu messen. Die Differenz ergibt die Tyrosinkerne, die den vorhandenen Polypeptiden entsprechen.

Burstein enteiweißt zuerst den Urin durch Kochen, dann wird neutralisiert und Zinkacetat beigegeben, um die Pigmente auszufällen, da diese teilweise durch das Folin'sche Reagens auch niedergeschlagen werden. Zu einer Menge des Filtrates, die 5 ccm Urin entspricht, wird 1 ccm Folin'sches Reagens hinzugefügt, der Niederschlag zentrifugiert, gewaschen und durch die Kjeldahl'sche Methode gemessen.

Goiffon und Spaey geben im Tagesurin, bei einer Menge von 1500 ccm, als normalen Wert die Zahl von 7 mg Polypeptid N an. Dieser Wert entspricht 0,47 mg % N.

Burstein kann mit seiner Methode den normalen Polypeptidgehalt im Urin nicht mehr quantitativ messen, dagegen erfaßt er 88 % der zum Urin hinzugefügten Polypeptide.

B. Beschreibung der bei den folgenden Untersuchungen angewandten Methode

Meine Methode sollte in möglichster Analogie zu der von Frau von May ausgearbeiteten Methode der Bestimmung der Serumpolypeptide aufgebaut werden. Ich benutzte deshalb wie Frau von May die folgenden Reagenzien:

Natrium Wolframat 10 %ig
Schwefelsäure $^2/_3$ n
Trichloressigsäure 20 %ig

Phosphor-Schwefelsäure-Mischung:

Acid. sulfuric. pur. d = 1,84	1 l =	1,840 kg
Anhydrid. acidi phosphorici		0,200 kg

Kalium-Kupfer-Sulfat-Mischung:

Kal. sulfuric.	75,0
Cupr. sulfuric.	15,0

Natrium hydr. solut. 30 %ig
Schwefelsäure $^1/_{100}$ n
Natrium hydr. $^1/_{100}$ n

Alkohol. Methylrotlösung:

Methylrot	0,025
Spirit.	37,5
Aqua dest. ad	50,0

Bei den ersten Versuchen wurden in vollständiger Analogie zu der von May'schen Methode die beiden Urinportionen, von denen der einen Natriumwolframat und der andern Trichloressigsäure beigesetzt wurde, filtriert und in beiden Filtraten nach der Mikrokjeldahl Methode der Stickstoff bestimmt. Da die Trichloressigsäure im Gegensatz zu der Wolframsäure die Polypeptide nicht ausfällt, so sollten die Polypeptide berechnet werden nach der Formel:
N des Trichloressigsäure-Filtrates (N_{TF}) minus N des Wolframsäure-Filtrates (N_{WF}) = N der Polypeptide (N_P).

Da aber N_{TF} und N_{WF} sehr hohe Werte waren, weil sie den Rest N enthielten, der im Urin bedeutend höher ist als im Blut, während N_P dagegen niedriger war als der Serumpolypeptidstickstoff, so stieß ich auf sehr ungünstige Voraussetzungen. Der Urinpolypeptid N beträgt ungefähr 2 mg % N, und dieser

kleine Wert mußte auf diese Weise aus der Differenz zwischen zwei hohen Zahlen, z. B. 1002—1000 = 2, errechnet werden. Die Methodik, die Ausfällen, Filtrieren, Veraschen und Kjeldahlisation in sich schließt, ergibt aber niemals bei so hohen Zahlen eine solche Genauigkeit, daß deren Differenz, die sehr klein ist und bei der die Fehler 500 Mal stärker ins Gewicht fallen, brauchbare Werte liefern könnte. Zudem ist der Rest N im Urin viel variabler als im Blut, — meine Versuche ergaben Werte zwischen 300 und 1200 mg % N — sodaß man bei der Titration meistens eine viel zu große Vorlage vorsetzen muß, da man nie weiß, in welchem Bereiche der Farbenumschlag erfolgt. Dieser Umstand bedingt eine weitere Fehlerquelle.

Da aber die Niederschläge bei den beiden Fällungen im Urin viel geringer sind als im Blut, wurde die Versuchsanordnung umgedreht und der Stickstoff in den beiden Niederschlägen bestimmt. Die Differenz mußte auch den Polypeptidstickstoff ergeben und die Formel lautete nun: N des Wolframsäure-Niederschlages (N_{WN}) minus N des Trichloressigsäure-Niederschlages (N_{TN}) = N der Polypeptide (N_P) wobei N_{TN} dem Eiweißgehalt des Urins entsprach.

Im Serum wäre diese Methode nicht anwendbar, weil dort der Eiweißgehalt sehr hoch ist und man auch aus der Differenz zweier hoher Werte auf eine relativ niedrige Zahl schließen müßte. Dies würde die gleiche Fehlerquelle bedingen, an der meine ersten Versuche scheiterten, nur mit umgekehrtem Vorzeichen.

Bei der von May'schen Methode der Bestimmung der Serumpolypeptide wird als „Nebenprodukt" der Rest N im Serum bestimmt. Dieses „Nebenprodukt" ist sehr erwünscht, da Aenderungen des Serumpolypeptidgehaltes vor allem bei Leber- und Nierenerkrankungen als Ausdruck eines toxischen Geschehens vorkommen, wo gerade das gleichzeitige Verfolgen des Rest N von größter Wichtigkeit ist.

Auf der andern Seite wird bei meiner Methode der Bestimmung der Urinpolypeptide als „Nebenprodukt" der Eiweißgehalt bestimmt, dessen Kenntnis von größtem Interesse ist, da doch bei jeder Urinuntersuchung auf Stoffe, die der Niere durch das Blut zugeführt werden, wie es ja bei den meisten Urinbestandteilen der Fall ist, vor allem die Frage der Permeabilität der Niere interessieren muß. Dieses Problem der Permeabilität der Niere für die Polypeptide kann man aber besser untersuchen, wenn man gleich-

zeitig die Permeabilität für die Eiweißmoleküle bestimmt, die den Polypeptidmolekülen nahe verwandt sind und sich von ihnen wohl nur durch ihre Größe unterscheiden.

Der Reaktionsgang, wie ich ihn schließlich zur Anwendung brachte, zerfällt in 5 verschiedene Abschnitte:

1. Vorbereiten des Urins.
2. Anstellen der Eiweiß- und Polypeptidfällung.
3. Waschen der Niederschläge.
4. Auflösen der Niederschläge.
5. Veraschen und Stickstoffbestimmung.

1. Vorbereiten des Urins

50 ccm Urin werden in einem großen Zentrifugierglas während 10 Minuten zentrifugiert. Damit wird der Urin von seinen morphologischen Bestandteilen befreit. Dann wird vorsichtig filtriert, so daß der Bodensatz zurückbleibt. Vom Filtrat pipettiert man je 10 ccm in 4 kleine Erlenmeyer.

2. Anstellen der Eiweiß- und Polypeptidfällung

a) Wolframsäure-Fällung

Zu den beiden ersten Portionen werden je 2 ccm Natr. Wolframat und 2 ccm Schwefelsäure ($^2/_3$ normal) hinzugefügt. Hierauf entsteht ein Niederschlag. Man läßt die beiden Erlenmeyer 10 Minuten stehen, damit sich der Niederschlag zusammenballen kann. Dann wird der Inhalt des Erlenmeyers quantitativ unter zweimaligem Nachspülen mit der unten angegebenen Waschflüssigkeit in ein spitzes Zentrifugierglas übergeführt und während einer halben Stunde auf hohen Touren von 3500 bis 4000 zentrifugiert. Als Gegengewicht dient der Kontrollversuch. Auf diese Weise erhält man eine klare Trennung des Niederschlages vom Filtrat. Man gießt hierauf die klare Flüssigkeit vorsichtig ab. Bevor man sie wegwirft, wird damit eine Kontrollprobe auf vollständige Fällung angestellt. Durch Hinzufügen von $^2/_3$ normaler Schwefelsäure läßt sich dies ohne weiteres kontrollieren. Nach Goiffon und Spaey erfolgt die vollständige Polypeptidausfällung durch das Folin'sche Reagens, sowie durch jede andere Form der Phosphorwolframsäure erst bei einem P_H von ungefähr 1.2. Da der Urin in Bezug auf sein Pufferungsvermögen viel

inkonstanter ist als das Serum, wird durch die durchschnittlich nötige Menge von 2 ccm Schwefelsäure dieses P_H zuweilen nicht erreicht. In diesem Fall erfolgt die Ausfällung durch die üblichen Mengen der Reagenzien nicht vollständig. Wenn durch die Kontrollreaktion eine unvollständige Ausfällung festgestellt wurde, so muß die Fällungsreaktion mit der doppelten Menge Schwefelsäure wiederholt werden. Fällt dagegen die Kontrollprobe negativ aus, so kann mit der Waschung der Niederschläge begonnen werden.

b) Trichloressigsäurefällung

Zu den anfangs abgemessenen Urinportionen 3 und 4 werden je 2 ccm 20 %ige Trichloressigsäure hinzugefügt. Der sich bildende Niederschlag ist meistens sehr gering und wird wegen seiner Feinheit mehrere Stunden stehen gelassen. Dann wird der Inhalt der Erlenmeyer unter zweimaligem Nachspülen mit der entsprechenden unten angegebenen Waschflüssigkeit quantitativ in ein Zentrifugierglas übergeführt und zentrifugiert. Mit der klaren über dem Niederschlage stehenden Flüssigkeit stellt man auch hier die Kontrollreaktion auf vollständige Ausfällung an. Die Kontrollreaktion wird aber nur selten positiv ausfallen und eine Wiederholung der Fällung unter Beigabe von 4 ccm Trichloressigsäure nötig machen. Wenn diese Probe negativ war, so wird mit dem Waschen der Zentrifugate begonnen.

3. Waschen der Niederschläge

Das Waschen der Niederschläge erfolgt mit den entsprechenden Fällungsmitteln, damit ein nachträgliches Auflösen von niedergeschlagenen Stoffen nicht möglich ist. Das Waschen hat den Zweck, die am Sediment hangengebliebenen Rest N Bestandteile des Urins derart zu verdünnen, daß sie keine Fehlerquelle mehr darstellen. Die Waschflüssigkeit besteht für:

die Wolframsäure-Niederschläge aus

aqua dest.	50,0
Natr. Wolframat. 10 %ig	10,0
acid. sulfuric. $^2/_3$ n	10,0

die Trichloressigsäure-Niederschläge aus

aqua dest.	50,0
Trichloressigsäure	10,0

Man fügt diese beiden Flüssigkeiten zu den entsprechenden Niederschlägen und zentrifugiert erneut während 10 Minuten. Nach Wiederholung dieser Prozedur sind die Niederschläge für die weitere Bearbeitung bereit.

4. Auflösen der Niederschläge

Das Auflösen der Niederschläge geschieht durch Hinzufügen von $^1/_{100}$ n NaOH. Diese wird in einem schwachen Strahle aus einer Burette auf die Seitenwand des schräg darunter gehaltenen Zentrifugierglases strömen gelassen, dabei wird das Glas ständig gedreht, um auf diese Weise eine Auflösung des an der Wand haftenden Niederschlages zu ermöglichen. ohne dabei das ganze Glas füllen zu müssen. Um mit einem Minimum von Lösungsmittel auszukommen wird der Niederschlag in der Spitze des Zentrifugierglases noch mit einem feinen Stahldraht aufgerührt. Wenn dabei die Auflösung noch nicht vollständig erfolgt und kleine Bröckel darin schwimmen, so bedeutet das für die quantitative Ueberführung in den Kjeldahlkolben keine Beeinträchtigung da nach dem Ueberführen dieser Lösung mit eventuell darin schwimmenden Bröckeln mehrmals sorgfältig mit NaOH und aqua dest. nachgespült wird. Wegen dieser mehrfachen Nachspülung darf man bei der Auflösung nicht zu viel Lösungsmittel verwenden, da sonst die Menge der Auflösungs- und Nachspülungsflüssigkeit den Mikrokjeldahlkolben zu stark füllen könnte, so daß beim Veraschen der Inhalt durch das Kochen überborden könnte.

5. Veraschung und Stickstoffbestimmung

Zu dem quanitativ in den Kjeldahlkolben gebrachten Niederschlag werden hinzugefügt:
1 ccm Phosphor-Schwefelsäure-Mischung und 1 Messerspitze Kalium-Kupfer-Sulfat-Mischung als Katalysator.
Der Inhalt des Kolbens wird unter dem Abzug erhitzt, dies hat über einer kleinen Flamme zu geschehen, damit ein Ueberborden der Flüssigkeit und eventuell darin schwimmender ungelöster Partikelchen verhütet wird.

Wenn die Flüssigkeit zu einem hellblauen Sirup eingekocht ist, muß man noch ungefähr 3 Minuten weitererhitzen. Dem abgekühlten Veraschungsgemisch wird etwas aqua dest. beigefügt.

Das Veraschungsgemisch wird dann quantitativ unter mehrfachem Nachspülen in den Pregl'schen Destillationsapparat gebracht. Nachdem noch 10 ccm Natr. hydr. sol. 30 %ig in den Apparat gebracht wurden, wird der Dampfstrom geöffnet und der sich bildende Ammoniak in einer Vorlage von 5 ccm Schwefelsäure $^1/_{100}$ normal aufgefangen. Die Vorlage enthält als Indikator 2 Tropfen der alkoholischen Methylrotlösung. Man destilliert 3 Minuten lang bei eingetauchtem Kühlrohr und guter Kühlung. Nach 3 Minuten wird die Vorlage gesenkt und noch eine Minute weiter destilliert. Zum Schluß wird das Kühlrohr mit etwas aqua dest. abgespült und die Vorlageflüssigkeit sofort mit NaOH bis zum Farbenumschlag titriert.

Vor jeder Destillation muß der Apparat tadellos sauber sein, die Sauberkeit ist von Zeit zu Zeit durch einen Leerversuch zu kontrollieren.

1 ccm Schwefelsäure $^1/_{100}$ normal wird durch 0,17 mg Ammoniak neutralisiert und entspricht 0,14 mg Stickstoff.

Man subtrahiert die beim Titieren zur Neutralisation notwendige Menge NaOH $^1/_{100}$ n von der Menge der vorgelegten Schwefelsäure $^1/_{100}$ n, und erhält dadurch die Menge Schwefelsäure $^1/_{100}$ n, die durch den Ammoniak bei der Destillation neutralisiert wurde. Bezeichnet man diese Menge bei dem destillierten Wolframsäure-Niederschlag als W, beim Trichloressigsäure-Niederschlag als T, so ergibt sich, wenn die Ausgangsmenge 1 ccm Urin war;

$W \times 0{,}14 \times 100 =$ mg % N des Wolframsäure-Niederschlages und $T \times 0{,}14 \times 100 =$ mg % N des Trichloressigsäure-Niederschlages. Da aber 10 ccm Urin verarbeitet wurden, sind diese Zahlen noch durch 10 zu dividieren, somit:

$W \times 0{,}14 \times \frac{100}{10} = W \times 1{,}4 =$ mg % N des Wolframsäure-Niederschlages und

$T \times 0{,}14 \times \frac{100}{10} = T \times 1{,}4 =$ mg % N des Trichloressigsäure-Niederschlages.

Daraus wird berechnet gemäß den früher angegebenen Formeln

Polypeptide in mg % N = W × 1,4 minus T × 1,4 und

Eiweiß in mg % N = T × 1,4.

Modifikation der Methode bei eiweißreichen Urinen

Um nicht zu große Fällungsmengen verarbeiten zu müssen, wird vorerst eine Probefällung angestellt. Man gibt zu diesem Zweck zu 10 ccm Urin je 2 ccm Natr. Wolframat und $^2/_3$ normale Schwefelsäure und zentrifugiert 5 Minuten lang auf hohen Touren. Diese Zeit genügt für diese Kontrollprobe. Je nach der Höhe des Niederschlages wird dann die für den Versuch notwendige Ausgangsmenge des Urins abgeschätzt. Der Niederschlag darf auf alle Fälle nicht höher als 4 bis 5 mm im Zentrifugierglas stehen. Größere Mengen würden für die Veraschung und Destillation mehr Reagenzien und mehr Zeit erfordern und eine größere Säurevorlage nötig machen. Die Ausgangsmenge beträgt dann je nach dem Eiweißgehalt 5, 2, oder sogar nur 1 ccm Urin. Bei diesen kleinen Mengen werden 5 ccm aqua dest. beigegeben, weil sich ein Ausgangsvolumen von 6—10 ccm zur weiteren Verarbeitung besser eignet.

Ergebnisse

A. Normaler Urin

Tabelle 1

Fälle	Klinische Diagnose	Konzentration in mg % N.					
		Polypeptide			Eiweiß		
		1. Wert	2. Wert	Differenz	1. Wert	2. Wert	Differenz
1.	Multiple S.	2,567	2,674	0,098	0,098	0,224	0,126
2.	Lues III	2,716	2,492	0,224	0,126	0,126	—
3.	Ulc. ventr.	2,072	2,464	0,392	0,056	0,084	0,028
4.	Bronchitis	2,436	2,310	0,126	0,098	0,084	0,014
5.	Sudeck Atr.	1,582	2,058	0,476	0,126	0,112	0,014
6.	Poliomyel.	1,540	1,526	0,014	0,070	0,070	—
7.	Angina lac.	1,988	2,310	0,322	0,042	0,056	0,014
8.	Ulc. ventr.	1,302	1,344	0,042	0,056	0,070	0,014
9.	Poliomyel.	1,456	1,358	0,098	0,126	0,084	0,042
10.	Chorea Hun.	2,128	2,296	0,168	0,154	0,126	0,028
11.	Poliomyel.	2,394	2,478	0,084	0,182	0,182	—
12.	Seropn. th.	1,834	1,904	0,070	0,098	0,154	0,056
	Durchschnitt	2,002	2,101	0,047	0,103	0,114	0,011

Tabelle 2

Das Verhalten der Tagesmenge (Mittelwert) in mg N

Fälle	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
Polypeptid	39	52	16	31	24	32	43	28	14	22	29	24
Eiweiß	2,4	2,6	0,5	1,2	1,6	1,5	1,0	1,3	1,0	1,4	2,2	1,7
Quotient $\frac{\text{Polypeptid}}{\text{Eiweiß}}$	16	20	32	26	15	22	43	21	14	16	13	14

Die in Tabelle 1 niedergelegten Werte stammen von Patienten, bei denen keine Veränderungen des Herzkreislaufsystems oder der Nieren nachzuweisen waren.

Die verarbeiteten Urinproben konnten somit als normal angesehen werden.

Beim Durchsehen der Tabelle fällt die Kleinheit aller Werte auf. Die Polypeptidwerte schwanken zwischen 1,3 und 2,7 mg % N, diejenigen für Eiweiß sogar zwischen 0,04 und 0,22 mg % N. Bei der Betrachtung der Doppelbestimmungen zeigen sich nur geringe Unterschiede. Diese betragen für die Polypeptide maximal 0.5 mg % N, für Eiweiß dagegen nur 0,12 mg % N. Im Vergleich zu den niedrigen Grundwerten stellen diese kleinen Unterschiede eine relativ große Fehlerquelle dar, in Anbetracht der Kompliziertheit der Methode und der Leistungsfähigkeit des Mikrokjeldahlverfahrens darf man die Doppelresultate als genügend übereinstimmend betrachten.

Bezüglich der absoluten Mengen der ausgeschiedenen Polypeptide läßt sich nichts bestimmtes sagen. Sie sind entsprechend den wechselnden Tagesurinmengen verschieden groß.

Bildet man das Verhältnis von Polypeptid N zu Eiweiß N, so erhält man eine Verhältniszahl, die sich bei den genannten Normalfällen stets über 12 hält. Da die Polypeptide und Eiweißkörper chemisch verwandte Substanzen sind, die sich nur durch ihre Molekulargröße voneinander unterscheiden, kann man wohl annehmen, daß sie in der Niere auf dieselbe Art und Weise ausgeschieden werden und aus ihrem gegenseitigen Verhältnis auf die Permeabilität der Niere schließen. Je kleiner der Quotient gefunden wird, desto größer war der Anteil der großmolekularen Eiweißstoffe und desto größer war die Permeabilität der Niere.

Die Werte für den Polypeptidgehalt des Urins liegen mit den oben erwähnten Schwankungen bei einem Mittelwert von

2,0 mg % N. Goiffon und Spaey, die ebenfalls nach dem Prinzip der Doppelstickstoffbestimmung aber mit anderer Stickstoffmessung gearbeitet haben, geben einen Durchschnittswert von 0,47 mg % N an, also ungefähr 4mal weniger. Dieselben Autoren haben nun auch eine Methode für die Bestimmung der Serumpolypeptide ausgearbeitet, die ihrer Methode für die Bestimmung der Urinpolypeptide völlig analog ist. Die mit dieser Methode gefundenen Serumwerte liegen bei 1,5—2,5 mg % N. Da Frau von May für die Serumpolypeptide einen Durchschnittswert von 8,0 mg % N findet, sind die Normalwerte für den Polypeptidgehalt im Serum nach der Methode von Goiffon ebenfalls ungefähr 4 mal kleiner. Daraus läßt sich der Schluß ziehen, daß die Urinwerte von Goiffon und Spaey mit meinen Werten übereinstimmen, wenn man die Zahlen relativ betrachtet; schon eingangs habe ich aber dargelegt, daß man absolute Zahlen nur bei der gleichen Methode vergleichen darf.

Andererseits muß festgestellt werden, daß bei der Methodik gewisse Fehlerquellen bestehen. So weist Burstein darauf hin, daß die Phosphorwolframsäure die Urinpigmente niederschlage, während durch die Trichloressigsäure keine Ausfällung der Urinpigmente stattfinde. Bei meinen Versuchen wurden immer nach dem Zentrifugieren der Niederschläge die Filtrate bei den beiden Fällungen hinsichtlich ihrer Farbe miteinander verglichen. Es wurde festgestellt, daß in beiden Fällen der Urin etwas entfärbt wird. Diese Entfärbung ist bei der Wolframsäure-Fällung etwas stärker als bei der Trichloressigsäure-Fällung. Andererseits enthielten auch die beiden Niederschläge etwas Pigment, der Wolframsäure-Niederschlag etwas mehr als der Trichloressigsäure-Niederschlag. Die Urinpigmente werden somit von beiden Fällungsmitteln, von der Wolframsäure allerdings etwas stärker ausgefällt. Da aber die Pigmente relativ arm an Stickstoff sind, so dürfte diese Fehlerquelle nur klein sein.

Die Eiweißwerte im normalen, vermeintlich eiweißfreien Urin sind sehr gering und liegen, gemessen durch den Trichloressigsäure-Niederschlag, im Durchschnitt bei 0,1 mg % N. Es ist schon lange bekannt, daß in jedem Urin Spuren von Eiweiß nachzuweisen sind, daß es eine physiologische Albuminurie gibt. Es werden aber in der Literatur gewöhnlich höhere Werte angegeben, so findet Mörner Zahlen von 3,6 mg % Eiweiß entsprechend ungefähr 0,6 mg % Eiweiß N. Möglicherweise liegt das daran, daß diese Autoren mit ihren Methoden die Polypeptide teilweise

mitbestimmten, während die Trichloressigsäure-Fällung nur die hochmolekularen Eiweißkörper erfaßt. Die kleinen Eiweißwerte bei meiner Methode liegen allerdings an der Grenze des Meßbaren, doch werden geringfügige Erhöhungen dieser kleinen Werte einwandfrei nachgewiesen.

B. Pathologisch veränderter Urin

Die Tabellen 3 und 4 zeigen die Verhältnisse beim pathologisch veränderten Urin. Diese Urinproben stammen von Patienten mit cardialen Stauungen, in einigen Fällen handelt es sich um Patienten mit anderen Affektionen.

Tabelle 3

Das Verhalten der Tagesmenge (Mittelwert) in mg N.

Fälle	Klinische Diagnose	Konzentration in mg % N.					
		Polypeptide			Eiweiß		
		1. Wert	2. Wert	Differenz	1. Wert	2. Wert	Differenz
1.	Die ersten 5 Fälle hatten alle cardiale Stauungszustände	0,616	0,630	0,014	0,126	0,070	0,056
2.		1,638	1,498	0,140	0,490	0,462	0,028
3.		1,344	1,064	0,280	0,182	0,280	0,098
4.		6,580	6,356	0,224	3,780	3,780	—
5.		30,66	28,56	2,100	49,28	51,80	2,520
6.	Purpura	4,788	4,956	0,168	0,336	0,294	0,042
7.	Hypertonie	5,404	5,404	—	2,296	2,184	0,112
8.	Colit. ulc.	2,688	1,834	0,854	0,336	0,336	—
9.	Sepsis len.	1,624	1,764	0,140	0,266	0,210	0,056
10.	Pyelitis	1,610	1,708	0,098	0,210	—	—
11.	Scharlachnephritis	3,850	4,830	0,980	4,830	4,550	0,280

Tabelle 4

Fälle	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.
Polypeptid	6,2	30	12	52	148	122	59	27	25	32	21
Eiweiß	1,0	9,1	2,3	30	253	8,0	25	4,0	3,6	4,0	23
Quotient $\frac{\text{Polypeptid}}{\text{Eiweiß}}$	6,2	3,3	5,2	1,7	0,58	15	2,4	6,7	7,0	7,9	0,93

Vergleicht man die gefundenen Resultate mit den vorher bestimmten Normalwerten, so fällt vor allem die starke Zunahme des Eiweißgehaltes auf. Oft ist auch eine Vermehrung des Polypeptid N festzustellen. Diese ist jedoch nie so stark wie die Eiweißvermehrung des entsprechenden Falles. Diese Tatsache muß sich natürlich auch auf das Verhältnis Polypeptid N zu Eiweiß N auswirken, und wir finden deshalb, mit Ausnahme eines Falles, stets Werte, die unter 10 liegen. Dies weist darauf hin, daß der Eiweißgehalt des Urins nicht nur absolut, sondern auch relativ zugenommen hat.

Bezüglich der Leistungsfähigkeit der Methodik läßt sich auch hier feststellen, daß die Unterschiede bei Doppelbestimmungen im allgemeinen nicht über 0.4 mg % N hinausgehen. Einzig bei Fall 5 ergab sich eine Differenz von 2,1 mg % N. Hier bestand aber eine viel stärkere Polypeptidurie und Albuminurie als bei den übrigen Fällen, so daß dieser größere Unterschied nur eine geringe Fehlerquelle darstellt. Die angewandte Methodik bewährte sich somit auch bei diesen pathologisch veränderten Urinen.

Diskussion

Goiffon, der im Urin zahlreiche Polypeptidbestimmungen machte, stellte fest, daß sich aus diesen Resultaten keine klaren Schlußfolgerungen ziehen ließen; in gewissen Fällen von Leberinsuffizienz fand er Werte bis zu 6 mg % (entspricht nach der hier beschriebenen Methode ungefähr 24 mg % N).

Da Goiffon die Polypeptide vor allem im Blut untersuchte und wie andere Autoren im Serum eine starke Erhöhung bei Leber- und chronischen Nierenleiden sowie bei Gewebszerfall infolge von Verbrennungen oder nach Operationen feststellte, die Polypeptide also als toxische Substanzen kennen lernte, wollte er wahrscheinlich durch seine Urinuntersuchungen Aufklärung über Elimination und Retention dieser schädlichen Stoffe erhalten, und die Rolle der Niere bei der „Polypeptidvergiftung" untersuchen.

Ich ging von einem andern Standpunkt aus, mich interessierten die Urinpolypeptide weniger in solchen Fällen, in denen die Serumpolypeptide stark erhöht waren, als in denjenigen Fällen, die bei völlig normalem Polypeptidgehalt im Serum, Veränderungen des Kreislaufes oder der Niere aufwiesen. Ich wollte nicht die Polypeptide in ihrer Eigenschaft als toxische Substanzen

betrachten, sondern, mehr vom physikalischen Standpunkte aus, als eiweißartige Stoffe von kleiner Molekulargröße, die bis zu einem gewissen Grade die Fähigkeit besitzen, durch die Darmwand und die Nierenmembranen hindurchzudringen. Es ging also mehr um das Problem der Permeabilität im allgemeinen. Es erschien deshalb einleuchtend, in jedem Falle auch die Durchlässigkeit der Niere für die großen Eiweißmoleküle zu messen und diese in Beziehung zu der Durchlässigkeit für die kleinen Polypeptidmoleküle zu bringen.

Bei Betrachtung der Werte für den Stauungsharn fällt auf, daß der Polypeptidgehalt nur in 2 Fällen erhöht ist, während er sich in 2 Fällen innerhalb der Norm und in einem Falle sogar unterhalb der Norm befindet. Dagegen sind die Eiweißwerte erhöht und dieser Umstand hat eine Verkleinerung des Verhältnisses Polypeptid N zu Eiweiß N zur Folge. Es ergibt sich daraus, daß der Polypeptid- und Eiweißgehalt des Urins bei erhöhter Nierenpermeabilität infolge von cardialer Stauung nicht in paralleler Weise zunehmen.

Andere Verhältnisse finden wir beim Fall 6, wo sowohl die Polypeptide als auch die Eiweißkörper auf etwas mehr als das Doppelte der normalen Werte erhöht sind, wo demzufolge der Quotient normal ist. Dieses ist umso bemerkenswerter, als es sich hier um einen Fall von Purpura anaphylactica handelte. Man kann daraus folgern, daß hier die erhöhte Durchlässigkeit der Niere für Polypeptide und Eiweiß anderer Art sein mußte als in den übrigen Fällen.

Daß in den meisten Fällen bei erhöhter Durchlässigkeit der Eiweißgehalt des Urins relativ stärker zunimmt, kann man sich durch die Betrachtung der entsprechenden Blutverhältnisse erklären.

Der normale Polypeptid N des Serums beträgt nur wenige mg $^0/_0$ n. Frau von May fand Werte zwischen 5 und 10 mg $^0/_0$ N. Bei einer vermehrten Durchlässigkeit der Nierenkapillaren kann somit die Polypeptidausscheidung theoretisch nur bis zu einem gewissen Grade zunehmen, nämlich solange bis das die Nieren durchströmende Blut von seinem Polypeptidgehalt befreit ist. Vermehrt sich unter pathologischen Verhältnissen der Polypeptidgehalt des Serums, so kann unter geeigneten Bedingungen der Polypeptidgehalt des Urins weiter ansteigen und erreicht dann sein Maximum erst auf einem höheren Niveau.

Ganz anders liegen die Verhältnisse für die Eiweißausschei-

dung. Hier ist das Blutangebot immer größer als die Möglichkeit der Ausscheidung. Mit der Verminderung der Kapillardichte muß deshalb die Albuminurie stetig anwachsen, und ihr Maximum wird theoretisch erst beim Auftreten einer massiven Hämaturie erreicht. Unter diesem Gesichtspunkte versteht man das raschere Anwachsen der Albuminurie bei erhöhter Durchlässigkeit der Nierenkapillaren im Vergleich zum trägeren Verhalten der Polypeptidurie und man begreift, daß schließlich die Albuminurie die Polypeptidausscheidung nicht nur relativ sondern auch absolut übertrifft.

Für die Beurteilung der Permeabilität der Nierenkapillaren erscheint mir der Quotient $\frac{\text{Polypeptid N}}{\text{Eiweiß N}}$ wichtiger als die absoluten Werte der betreffenden Urinfraktionen. Diese beiden sind nämlich wie die übrigen Urinbestandteile nicht nur von der Durchlässigkeit der Nierenkapillaren, sondern auch von der Konzentrationsarbeit der Niere abhängig. Bei gleicher Kapillarpermeabilität entsteht wohl stets das gleiche Glomerulusfiltrat. Dasselbe wird aber auf seinem Weg durch die Nierenkanälchen mehr oder weniger stark eingedickt, und so ergibt sich im Einzelfall eine ganz verschiedene Polypeptid- und Eiweißkonzentration. Weil diese Konzentrationsarbeit in den Nierenkanälchen sich ändern kann, ist es nicht angängig, aus der absoluten Eiweißmenge im Urin auf die Permeabilität der Nierenkapillaren zu schließen. Auch wenn man aus diesem Grunde die Tagesmenge mitberücksichtigt, so erhält man kein zuverlässiges Bild der Kapillarpermeabilität, weil die Urinmenge nicht genau in demselben Maße zunimmt wie die Konzentrationsarbeit der Nierenkanälchen abnimmt. Urinmenge und spezifisches Gewicht stellen keine absolut reziproke Funktion dar.

Ein Beispiel für diese Verhältnisse geben uns die Zahlen der Fälle 1 und 2 (Tabelle 3). Diese stammen vom gleichen Patienten, die beiden Untersuchungen fanden aber an verschiedenen Tagen statt.

Datum der Untersuchung	19. 10. 40.	22. 10. 40.
Polypeptide in mg % N	0,62	1,57
Eiweiß in mg % n	0,10	0,48
Urin Tagesmenge in ccm	1000	1900
spez. Gewicht	1018	1019
Polypeptide Tagesmenge mg N	6,2	29,83
Eiweiß Tagesmenge in mg N	1,0	9,12
Quotient $\frac{\text{Polypeptide}}{\text{Eiweiß}}$	6,2	3,3

Wenn man in diesen beiden Fällen die Durchlässigkeit der Niere für das Eiweis beurteilen wollte aus der Eiweißmenge pro 100 ccm Urin, so fände man die Permeabilität bei der 2. Untersuchung 4mal größer, wenn man dabei die Tagesmenge mitberücksichtigen wollte, so fände man sie sogar 9mal größer und die erste Untersuchung ergäbe für das Eiweiß überhaupt einen normalen Wert. Bringt man aber die Eiweißausscheidung in Beziehung zu der Polypeptidausscheidung und berechnet den Quotienten, so findet man Werte, die bedeutend näher beieinander liegen und in beiden Fällen Werte, die unterhalb der Norm liegen, deren untere Grenze sich bei 10—12 befindet.

Der Polypeptid- und Eiweißgehalt des Glomerulusfiltrates werden von der tubulären Resorptionstätigkeit in gleicher Weise beeinflußt, so daß sich der Quotient gebildet aus den beiden Fraktionen dadurch nicht zu ändern braucht. Er gibt uns deshalb ein besseres Bild von der relativen Größe der Eiweiß- und Polypeptiddurchlässigkeit der Glomeruluskapillaren als die durch die Konzentrationsarbeit der Nieren beeinflußten absoluten Werte. Dies gilt ganz besonders für die Verhältnisse des Stauungsharns, bei dem die Polypeptid- und Eiweißkonzentration nicht in gleicher Weise verändert sind und wo der Quotient aus den beiden Fraktionen infolge der gesteigerten Kapillardurchlässigkeit eine wesentliche Verkleinerung erfahren hat.

Wenn man aus dem Verhalten dieses Quotienten auf die Permeabilität der Nierenkapillaren schließen will, muß man allerdings daran denken, daß dieser Quotient auch durch eine Eiweißausscheidung in den ableitenden Harnwegen so zum Beispiel durch Entzündungsprozesse, die mit Exsudation verbunden sind, beeinflußt werden könnte. Ich habe deshalb die Verhältnisse bei einem Fall, der kürzlich eine Pyelitis durchgemacht hatte, untersucht (Fall 10, Tab. 3). Es ergab sich ein normaler Polypeptidgehalt von 1,66 mg % N Durchschnitt der beiden Messungen, dagegen ein Eiweißgehalt, der ungefähr auf das Doppelte der Norm erhöht war, 0,21 mg % N. Demgemäß sank auch der Quotient auf den pathologischen Wert von 7.9. Da in diesem Falle wahrscheinlich noch eine Exsudation durch die kürzlich entzündeten Schleimhäute stattfand, wäre es wohl kaum richtig, aus dem niedrigen Quotienten auf eine abnorme Durchlässigkeit der Nierenkapillaren zu schließen.

Die erhöhte Durchlässigkeit der Nierenmembranen speziell der Glomeruli spielt bei der Bright'schen Krankheit eine sehr

wichtige Rolle. Gemeint ist hier die abnorme Durchlässigkeit für das Eiweiß, die Albuminurie. Volhard bezeichnet diesen Faktor neben der Abnahme der sekretorischen Nierenleistung und der Störung der Nieren- bzw. Glomerulidurchblutung als einen der 3 Hauptfaktoren in der Pathologie der Bright'schen Krankheit. In einem Falle von Scharlachnephritis (Fall 11, Tab. 3) fand ich einen sehr stark heraufgesetzten Quotienten von 0,93, bei dem der Eiweißgehalt sehr stark, der Polypeptidgehalt mäßig gesteigert war. Es erhebt sich nun die Frage, ob man hier aus diesem Quotienten unmittelbar auf die Permeabilität der Nierenkapillaren schließen darf, dies darf man aus den eben erwähnten Gründen nur tun, wenn man eine Exsudation in den Harnwegen unterhalb der Glomeruli ausschließen kann. Es ist nun aber eine andere Frage, ob man bei einer Nephritis, auch wenn es eine Glomerulonephritis ist, eine pathologische Veränderung der Nierenkanälchen, die mit Exsudation verbunden ist, ausschließen kann. Deshalb darf man den Quotienten für die Beurteilung der Nierenkapillarenpermeabilität bei der Bright'schen Krankheit wohl nur unter Vorbehalt verwenden.

Es wird noch weiterer Untersuchungen bedürfen, um festzustellen, ob die angegebene Methodik Urinveränderungen, und speziell Veränderungen der Nierenpermeabilität, die unter andern Bedingungen zum Beispiel bei der sportlichen Ermüdung vorkommen, zu erfassen vermag.

Zusammenfassung

Es wird eine Methode beschrieben, die den Nachweis geringer Eiweiß- und Polypeptidmengen im Urin gestattet. Auf diese Weise ließ sich das Vorhandensein einer geringgradigen physiologischen Albuminurie und Polypeptidurie erneut bestätigen. Unter pathologischen Verhältnissen, so besonders bei cardialer Stauung, konnte eine Vermehrung beider Urinbestandteile festgestellt werden. Es handelte sich allerdings nicht um eine gleichmäßige Erhöhung der beiden Urinfaktoren, sondern um ein stärkeres Hervortreten der Albuminurie, was eine starke Verkleinerung des Quotienten $\frac{\text{Polypeptid N}}{\text{Eiweiß}}$ zur Folge hatte. Dieser Quotient erschien schließlich für die Beurteilung der Permeabilität der Nierenka-

pillaren wichtiger als die absoluten Werte des Eiweiß- und Polypeptidgehaltes, weil dieselben nicht nur von der Durchlässigkeit der Glomeruli, sondern auch von der tubulären Resorptionstätigkeit abhängig sind. Das Verhältnis der beiden Fraktionen ändert sich dagegen nicht, weil bei der Eindickung des Glomerulusfiltrates Zähler und Nenner um den gleichen Prozentsatz zunehmen, vorausgesetzt, daß in den Harnwegen unterhalb der Glomeruli keine Ausscheidung von eiweißartigen Substanzen zum Beispiel durch pyelitische Prozesse stattfindet.

Die bisherigen Erfahrungen berechtigen zu der Hoffnung, daß sich auch leichtere Permeabilitätsstörungen der Nierenkapillaren mit Hilfe der angegebenen Methode erfassen lassen.

Literaturverzeichnis

Burstein: Journ. Physiol. et Path. gén. *35,* 1937, 71.
Duval und Roux: Journ. méd. français *27,* 1938, 1.
Fiessinger: ibidem *27,* 1938, 17.
Goiffon: ibidem *27,* 1938, 13.
Goiffon und Spaey: Bull. Soc. Chim. Biol. *16,* 1934, 1686.
Hahn: Biochem. Z., *121,* 1921.
Horn: Ueber die Verwendbarkeit der Donaggioreaktion im Blutserum, Diss., Bern.
Martens: Arch. int. Méd. exp. *8,* 1933, 361.
von May: Der Polypeptidspiegel im menschlichen Serum. Diss. Bern.
Mörner: zit. nach Neubauer-Huppert: Analyse des Harns. Wiesbaden, 1913.
Volhard: Münchn. med. Woschr. 1940, 877.
Wolff: Ann. Med. Paris *10,* 1921, 185.